临床研究

LRG-1在舌癌组织及舌癌细胞系Tca8113中的表达及意义

郝丽静[1,2],郑文娇[1,2],王淑芬[1,2],郑 颖[1],何韶衡[2],张 斌[1]
辽宁医学院附属第一医院[1]口腔科,[2]变态反应与临床免疫研究中心,辽宁 锦州 121001

摘要:目的 探讨富亮氨酸α2糖蛋白1(LRG-1)在舌癌及舌癌细胞系Tca8113中的表达及其与舌癌临床病理参数的关系并分析LRG-1的临床意义。**方法** 采用S-P免疫组织化学方法检测我院40例浸润性舌癌患者的病灶及癌旁正常组织、20例舌部不典型性增生组织、20例舌原位癌中LRG-1的表达,分析LRG-1表达与舌癌临床病理参数的相关性;流式细胞技术检测舌癌细胞系(Tca8113)中LRG-1的表达;Western blotting法检测舌癌组织及细胞系Tca8113中LRG-1的表达;MTT法检测LRG-1对人血管内皮细胞生长的影响;体外小管形成实验观察LRG-1对血管生成的影响。**结果** LRG-1阳性表达率在舌癌组织中(85%,34/40)显著高于癌旁正常组织(10%,4/40),亦显著高于舌部不典型性增生组织(30%,6/20)及舌原位癌(50%,10/20),差异均有统计学意义(P<0.05)。LRG-1在舌癌组织中的表达与患者年龄、性别等不相关,而与组织分化程度、临床分期及淋巴结转移有相关性(P<0.05)。LRG-1能够促进血管内皮细胞的增殖和小管形成。**结论** LRG-1在舌癌组织及细胞系中表达异常,且能够促进血管内皮细胞的生长和小管形成,提示其可能与肿瘤血管生成有关。

关键词:富亮氨酸α2糖蛋白1;舌鳞癌;Tca8113;血管生成

Expression of LRG-1 in clinical specimens and Tca8113 cell line of tongue carcinoma

HAO Lijing[1,2], ZHENG Wenjiao[1,2], WANG Shufen[1,2], ZHENG Ying[1], HE Shaoheng[2], ZHANG Bin[1]
[1]Department of Dentistry, [2]Allergy and Clinical Immunology Research Center, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: Objective To investigate the expression of LRG-1 in clinical specimens and Tca8113 cell line of tongue carcinoma and analyze the relationship between LRG-1 expression and the clinicopathological parameters. **Methods** LRG-1 expression was detected in 40 tongue squamous cell carcinoma (TSCC) tissues and paired normal adjacent tissues, 20 atypical hyperplasia tissues of the tongue, and 20 tissues of tongue cancer *in situ* using immunohistochemical method. The expression of LRG-1 in Tca8113 cell line was detected using flow cytometry. The expression of LRG-1 was also detected in human TSCC tissues and Tca8113 cells with Western blotting. The effect of LRG-1 on the proliferation of HUVECs was determined using MTT assay, and its effect on angiogenesis was evaluated with Matrigel tube formation assays. **Results** Human TSCC tissues had a significantly higher rate of positive expression for LRG-1 (85%, 34/40) than the adjacent tissues (10%, 4/40), invasive tongue cancer (30%, 6/20), and tongue cancer *in situ* (50%, 10/20) (P<0.05). LRG-1 expression was correlated with the degree of tumor differentiation, clinical stage and lymph node metastasis of the tumor (P<0.05) but not with the patients' age or gender. In the *in vitro* experiment, LRG-1 promoted HUVEC proliferation and angiogenesis. **Conclusion** Abnormal LRG-1 expression is present in the human TSCC tissue and Tca8113 cells. LRG-1 can promote HUVEC proliferation and angiogenesis *in vitro*, suggesting its possible role in promoting tumor angiogenesis.

Key words: LRG-1; squamous cell carcinoma of tongue; Tca8113 cells; angiogenesis

口腔癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其中舌癌又是最常见的口腔癌,多数为鳞癌。近年来舌癌的发病率有增高趋势,但患者的生存率却无明显改善。大部分患者确诊时已经是晚期,处于第Ⅲ期或第Ⅳ期,这是降低患者生存率的一个重要因素[1-2]。因此,预防舌癌的发生,探索其发病机制,发现新的早期诊断标志物成为目前研究的重点。Ki-67、p53、HOX基因和Ⅳ型胶原酶等是近年来发现的较新的口腔鳞癌的生物学标志物,对诊断和治疗口腔鳞癌意义重大[3]。有研究表明富亮氨酸α2糖蛋白1(LRG-1)在肝癌[4]、胰腺癌[5]、卵巢癌[6]、肺癌[7]和结直肠癌[8]等多种肿瘤中的表达较正常人高。又有研究发现LRG-1表达升高与血管生成有密切关系[9]。血管生成是指在原有的毛细血管和(或)微静脉基础上通过血管内皮细胞的迁移和增殖,从已存在的血管处以芽生或非芽生形式形成新的、以毛细血管为主的血管系统过程。内皮细胞活化增殖是血管生成的起始阶段[10]。故研究血管内皮细胞的增值情况即可大致反应血管生成的情

收稿日期:2015-11-16
基金项目:国家自然科学基金(81471592);辽宁省教育厅科学研究项目(05L141)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81471592).
作者简介:郝丽静,硕士研究生,E-mail: 1028548274@qq.com
通信作者:何韶衡,博士,长江学者,教授,E-mail: shoahenghe@hotmail.com;张 斌,博士,主任医师,E-mail: 18841609084@163.com

况。但LRG-1在舌癌中的表达情况及其参与舌癌发生、发展的相关机制尚不清楚。本实验旨在体外检测LRG-1在舌癌组织及细胞系的表达,以及LRG-1对人血管内皮细胞增殖及小管形成的影响,初步探讨其在舌癌组织中的表达变化及其对肿瘤血管生成的影响,为进一步研究其生物学作用及可能存在的致病机制提供实验依据。

1 资料和方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640培养基:美国Corning。胎牛血清:美国Gibco。兔抗人LRG-1单抗、HRP标记的驴抗兔IgG、PE标记的鼠抗兔IgG:美国LifeSpan BioSciences。重组人LRG-1:上海江莱生物科技有限公司。噻唑蓝(MTT):美国Sigma进口分装。Matrigel:美国BD。

1.2 细胞株

人舌癌细胞株Tca8113细胞由上海拜力生物公司购得;人脐静脉内皮细胞HUVEC由ATCC细胞库购得。

1.3 临床资料

收集2005~2015年辽宁医学院附属第一医院病理科保存的浸润性舌癌标本40例,舌部不典型性增生组织20例、舌原位癌组织20例,患者术前均未接受化疗及放疗。其中浸润性舌癌中男性28例,女性12例,年龄40~75岁,平均52岁。组织学分类:高分化15例,中低分化25例。有淋巴结转移22例,无淋巴结转移18例。根据国际抗癌联合会(UICC)分期:Ⅰ期17例,Ⅱ期12例,Ⅲ期6例,Ⅳ期5例。所有标本均经镜下病理检查证实。40例癌旁正常组织均采用距离肿瘤至少2 cm且术中病理证实切缘为阴性的舌体组织。临床病理资料包括性别、年龄、分化程度、淋巴结转移、肿瘤分期。

1.4 方法

1.4.1 免疫组织化学染色　选取与HE染色一致的典型蜡块做4 μm厚连续切片。切片脱蜡至水,3% H_2O_2消除内源性过氧化物酶,组织抗原微波加热修复,5% BSA封闭非特异性抗原,加入兔抗人LRG-1单抗,4 ℃过夜,滴加HRP标记的驴抗兔IgG工作液,37 ℃孵育1 h,PBS冲洗3次,5 min/次;DAB显色,苏木素复染,常规脱水、透明、中性树胶封片。染色结果判读:镜下观察以肿瘤细胞中出现清晰棕黄色颗粒判定为阳性细胞。根据反应强度和范围分为:阴性(-):未见阳性细胞;阳性(+):阳性细胞未超过半数且染色较浅;强阳性(++):阳性细胞超过半数且染色较深。

1.4.2 细胞培养　舌癌细胞株Tca8113、人脐静脉内皮细胞HUVEC均采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(内含青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L)培养,置于含5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中。每1~2 d传代1次,取对数生长期细胞进行实验。

1.4.3 流式细胞技术检测舌癌细胞系(Tca8113)中LRG-1的表达　取对数生长期细胞,常规胰酶消化后,制成单细胞悬液,离心弃上清,再经PBS缓冲液洗涤两次。BD破膜试剂盒进行破膜,重悬细胞,在实验组细胞悬浮液中加入5 μL兔抗人LRG-1单抗,同型组加入同型一抗,轻轻混匀后于2~8 ℃避光条件下孵育30 min,洗涤,再加入5 μL PE标记的鼠抗兔IgG后轻轻混匀于2~8 ℃避光条件下孵育30 min,洗涤,200 μL PBS重悬,上机行流式细胞仪检测。实验重复3次。

1.4.4 Western blotting检测临床标本及细胞系中LRG-1的表达　临床上所取新鲜舌癌组织及癌旁组织冲洗后剪碎,匀浆,裂解后抽提蛋白并定量;Tca8113细胞预冷PBS冲洗,裂解后抽提蛋白并定量。取50 μg总蛋白经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭1 h,加兔抗人LRG-1单抗及β-actin单抗4 ℃孵育过夜、洗膜,加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育2 h,洗膜,ECL法显色后GIS凝胶图像分析系统拍照并分析处理。以上实验重复3次。

1.4.5 MTT法检测内皮细胞增殖情况　将处于生长对数期的HUVEC细胞经胰酶消化、重悬、按每孔100 μL种于96孔板,每孔含1000个细胞,设4个复孔,5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中培养24 h,弃去培养液。加入LRG-1浓度为5、10、20、40、50 μg/mL的培养液,另设置不加LRG-1的阴性对照组和阳性对照组血管内皮生长因子-VEGF(10 ng/mL)。继续培养6 h后,每孔加入15 μL MTT,4 h后吸弃孔中液体,每孔加入100 μL DMSO,摇床震荡10 min,使结晶物溶解。酶标仪在570 nm波长下检测每孔的吸光度(A)值,以上实验重复3次。

1.4.6 LRG-1对人脐静脉内皮细胞HUVEC小管生成的影响　Matrigel基质胶4 ℃过夜冻融,次日,在预冷的96孔板中加入50 μL融化的Matrigel基质胶溶液,在37 ℃放置30 min成胶。按细胞悬液2×10^4/孔加入板中,放入CO_2培养箱培养24 h。分为阴性对照组和实验组,实验组分别是LRG-1浓度为5、10、20、40、50 μg/mL,每组设置5个复孔。CO_2培养箱培养6 h。光学显微镜下观察内皮细胞小管的形成情况,每孔随机取5个视野,数码相机拍照,计数形成的小管的个数。

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件处理数据,计数资料组间比较采用χ^2检验;计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用方差分析;计数资料与计量资料的统计分析均以P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测LRG-1的表达

结果显示,LRG-1在舌癌组织中呈不同程度的表

达(图1)。LRG-1的表达主要定位于胞浆中,细胞核亦可见染色,各标本LRG-1着色深浅不一。癌旁组织不表达LRG-1或仅在上皮基底细胞层显弱阳性着色。40例浸润性舌癌组织中,34例LRG-1呈阳性表达,阳性表达率为85%;癌旁正常组织中,4例LRG-1阳性表达,阳性表达率为10%;χ^2=45.113,P<0.05,差异有统计学意义。因此得出:舌癌组LRG-1阳性率高于癌旁组。20例舌部不典型性增生组织中LRG-1的阳性表达率为30%;20例舌原位癌组织中LRG-1的阳性表达率为50%;二者与浸润性舌癌组织比较,差异均有统计学意义(P<0.05,表1)。另外,LRG-1在浸润性舌癌组织中的表达与患者年龄、性别等不相关,而与组织分化程度、临床分期及淋巴结转移有相关性(P<0.05),组织分化程度越低和临床分期越高的舌癌组织中LRG-1的表达越高。发生淋巴结转移的舌癌组织中LRG-1的表达较未转移者高(表2)。

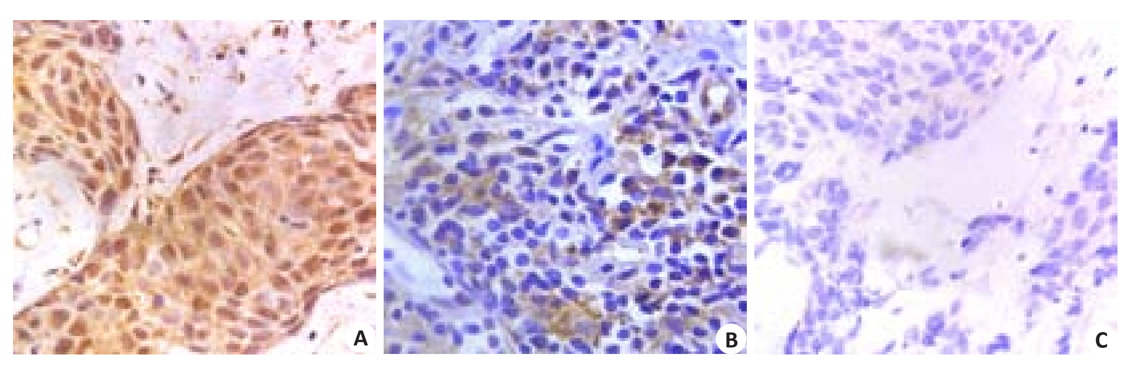


图1 LRG-1在舌癌组织中呈不同程度的表达

Fig.1 Expression of LRG-1 in human TSCC tissue (Original magnification: × 400). *A*: Strong positive expression (++); *B*: Weak positive expression (+); *C*: Negative expression (-).

表1 LRG-1在不同类型舌组织中的表达

Tab.1 Expression of LRG-1 in different tongue tissues

Tissue	Total number	Number of LRG-1 (+ and ++)	Positive rate of LRG-1 (%)
Invasive tongue cancer	40	34	85%
Normal tissue beside tongue cancer	40	4	10%*
Tongue atypical hyperplasia	20	6	30%*
Tongue cancer *in situ*	20	10	50%*

*P<0.05 *vs* invasive tongue cancer.

表2 LRG-1表达的强弱与舌癌临床病理参数的关系

Tab.2 Relationship between LRG-1 expression and clinicopathological parameters of tongue cancer

Clinical characteristics	Number of LRG-1 (+ and ++)	LRG-1 (++)	LRG-1 (+)	P
Clinical stage				
Ⅰ-Ⅱ	23	12	11	0.027
Ⅲ-Ⅳ	11	10	1	
Differentiation				
Well	10	3	7	0.006
Moderately and Poorly	24	19	5	
LN metastasis				
Yes	22	18	4	0.005
No	12	4	8	
Gender				
Male	23	17	6	0.104
Female	11	5	6	
Age(year)				
≥52	21	16	5	0.075
<52	13	6	7	

2.2 流式细胞技术检测结果

用流式分析软件分析得出,实验组LRG-1呈阳性表达(图2)。Tca8113细胞中LRG-1阳性细胞的百分数:同型对照组为0.15±0.04,实验组为89.37±7.00,实验组与同型对照组相比,差异有统计学意义(P<0.05);Tca8113细胞中LRG-1阳性细胞的平均荧光强度:同型对照组为587±171.67;实验组为2708±184.19,实验组与同型对照组相比,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 Western blotting 检测结果

结果显示在舌癌组织及舌癌细胞Tca8113中可以看到明显条带,而在癌旁正常组织中条带较浅,说明舌癌组织及舌癌细胞Tca8113中LRG-1表达水平高于癌旁正常组织(图3)。

2.4 MTT法检测不同处理对内皮细胞活力的影响

实验中使用不同浓度的LRG-1(0、5、10、20、40、50 μg/mL)及VEGF(10 ng/mL)处理HUVEC细胞6 h

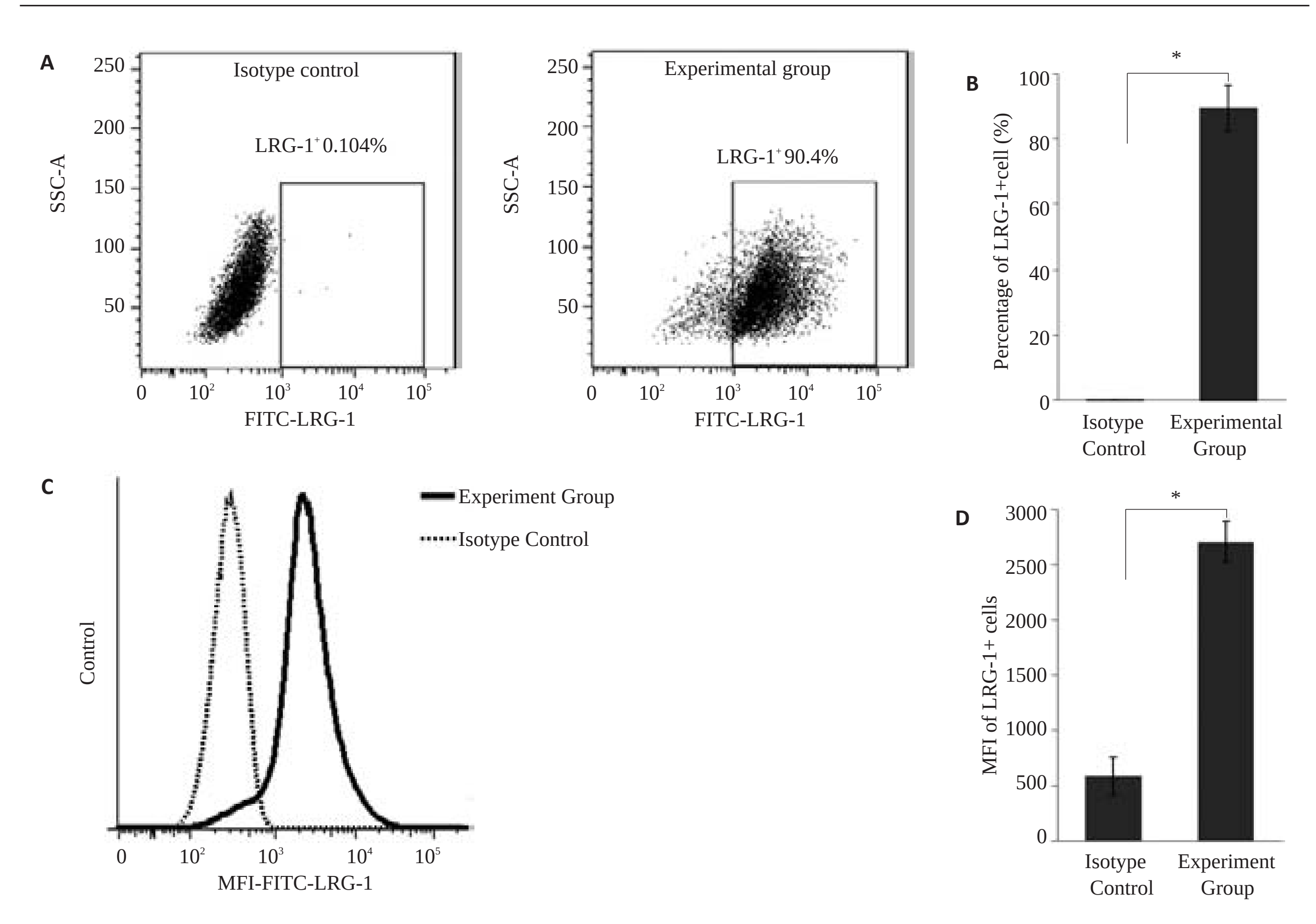


图2 Tca8113细胞中LRG-1的表达情况

Fig.2 Expression of LRG-1 in Tca8113 cells. *A*: Flow cytometric analysis of the percentage of LRG-1+ cells in Tca8113 cells; *B*: Comparison of the percentage of LRG-1+ cells (*P<0.05); *C*: Analysis of the mean fluorescence intensity of LRG-1+ cells by flow cytometry; *D*: Comparison of the MFI of LRG-1+ cells (*P<0.05).

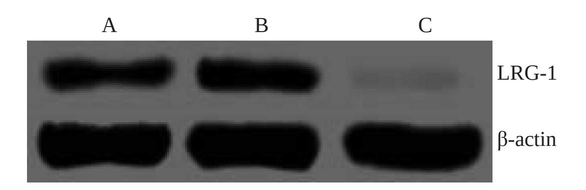


图3 Western blotting 检测舌癌组织及Tca8113中LRG-1的表达

Fig.3 Western blotting for detecting the expression of LRG-1 in the human TSCC tissue and Tca8113 cells. A: Tca8113 cells; B: Tongue squamous cell carcinoma (TSCC) tissue; C: Adjacent tissues of TSCC.

后，MTT法检测LRG-1对HUVEC细胞活力的影响。结果表明，随着LRG-1浓度的升高，内皮细胞的活性及数量不断增高（表3）。不同浓度的LRG-1组与阴性对照组比较，差异有统计学意义（P<0.05）；不同浓度的LRG-1组间比较差异也有统计学意义（P<0.05）。且LRG-1浓度为50 μg/mL时，血管内皮细胞的活性高于阳性对照组-VEGF（10 ng/mL）处理组（P<0.05）。结果表明LRG-1能明显促进HUVEC细胞生长。

表3 LRG-1对HUVEC细胞增殖的影响

Tab.3 Effect of LRG-1 on proliferation of HUVECs (absorbance)

Group	Experiment			*Mean±SD*
	1	2	3	
LRG-1 (0 μg/mL)	0.1567	0.1628	0.1618	0.1604±0.0033
LRG-1 (5 μg/mL)	0.1944	0.1828	0.1928	0.1900±0.0063
LRG-1 (10 μg/mL)	0.2040	0.2246	0.2267	0.2184±0.0125
LRG-1 (20 μg/mL)	0.3502	0.3326	0.3327	0.3385±0.0101
LRG-1 (40 μg/mL)	0.4302	0.4234	0.4433	0.4323±0.0101
LRG-1 (50 μg/mL)	0.6155	0.6153	0.6250	0.6186±0.0055
VEGF (10 ng/mL)	0.5278	0.5363	0.5118	0.5253±0.0124
F				1103.012
P				0.000

2.5 LRG-1对HUVEC小管生成的影响

体外小管形成实验结果表明LRG-1能够促进HUVEC的体外小管形成。且随着LRG-1浓度的升高，小管数目逐渐增多，且结构也变得紧密完整（图4）。

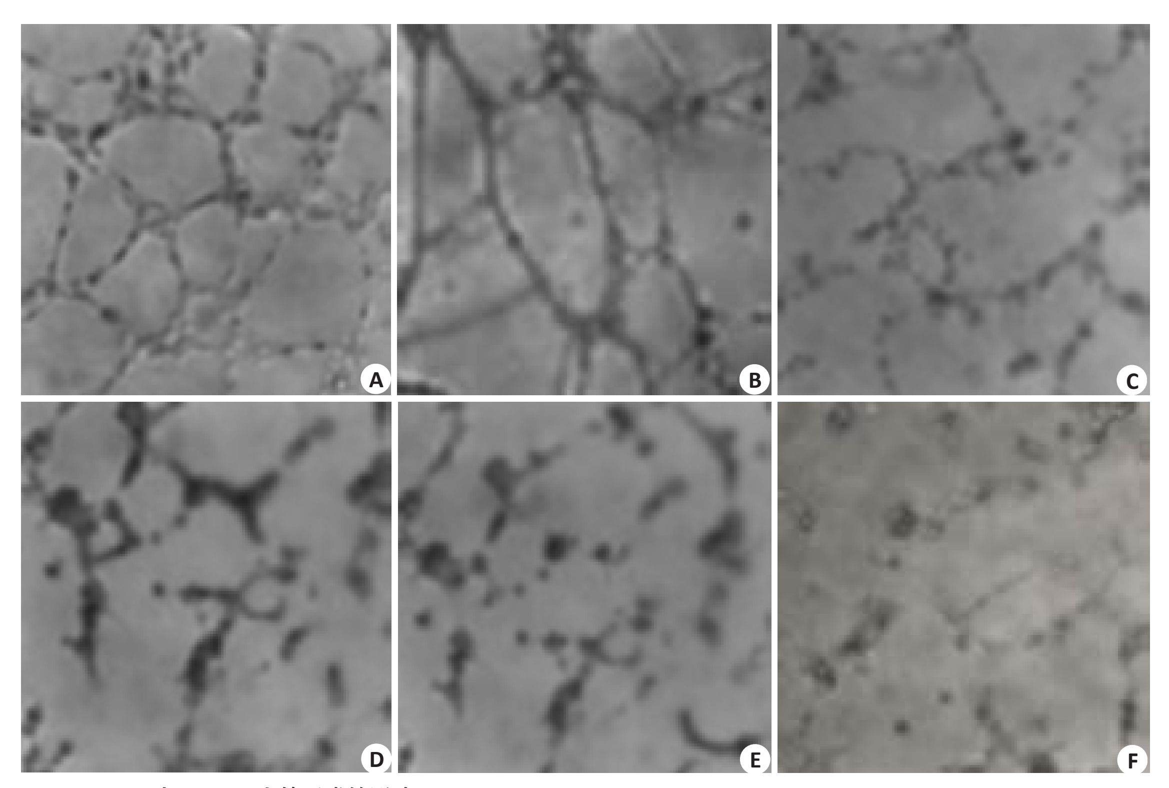


图4 LRG-1对HUVEC小管形成的影响

Fig.4 Effect of LRG-1 on tube formation of HUVECs (Original magnification: ×400). *A*: LRG-1 (50 μg/mL); *B*: LRG-1 (40 μg/mL); *C*: LRG-1 (20 μg/mL); *D*: LRG-1 (10 μg/mL); *E*: LRG-1 (5 μg/mL); *F*: Negative control.

3 讨论

1977年Haupt和Baundner从人血清中分离出LRG1,并在1985年又决定了它的氨基酸序列。LRG-1是富亮氨酸重复序列(LRR)家族的一员[11], LRRs通常在细胞黏附、生存、信号转导及基因修复、重组、转录等过程中发挥重要作用[12]。它在骨髓造血时表达,尤其在中性粒细胞系分化时表达较高[13]。LRG-1在正常人血浆中的浓度为21~50 μg/mL[14-15]。近年来,有研究发现,LRG-1的异常表达与多种组织恶性肿瘤的发病有关,如肝癌[4]、胰腺癌[5]、卵巢癌[6]、肺癌[16]和结直肠癌[8]等,并且LRG-1在这些肿瘤中表达均上调最新研究发现,LRG-1能够促进血管生成,尤其是异常血管的生长[9]。LRG-1通过结合到其辅助受体endoglin (ENG),从而激活TGF-β血管生成的开关,这使得TGF-β信号远离维持正常血管的信号通路,转向了促进有害血管生成的方向,活化了促血管生成信号TGF-β R-Ⅱ,进而招募内皮TGF-β R-I激活素受体样激酶-1(ALK-1),而ALK-1反过来又能够启动激活转录因子Smad 1,5和8,从而发挥其促进血管生成的作用[17]。众所周知,血管生成是一个重要的生物学过程,是发育、生殖以及损伤组织修复的必要条件。然而,异常的血管生成在多种疾病如肿瘤中发挥着重要的作用。以肿瘤中的血管生成为例,良性肿瘤血管生成稀少,血管生长缓慢;而大多数恶性肿瘤的血管生成密集且生长迅速。因此,血管生成在肿瘤的发生、发展以及转移的过程中发挥着极为关键的作用[18]。以此推测LRG-1在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。

舌癌是口腔颌面部最为常见的恶性肿瘤,有研究表明口腔鳞癌中约为61.4%为舌癌。尽管采用了扩大根治性手术和辅助放射治疗,但治疗效果欠佳,最常见的情况是局部、区域性复发和远处转移。有研究表明舌癌一旦复发,预后很差,3年生存率不足25%[19]。目前多数学者认为,舌癌的发生、发展与肿瘤细胞中的基因表达调控异常有关。在目前现有的治疗方法基础上,探索安全有效的基因治疗,有望进一步提高口腔鳞癌的综合治疗效果。

本研究发现LRG-1在浸润性舌癌组织及舌癌细胞系Tca8113中呈高表达,在舌部不典型性增生组织及舌原位癌中的表达较浸润性舌癌组织低,LRG-1在浸润性舌癌组织中的表达与患者年龄、性别等不相关,而与组织分化程度、临床分期及淋巴结转移有相关性,组织分化程度越低和临床分期越高的舌癌组织中LRG-1的表达越高,发生淋巴结转移的舌癌组织中LRG-1的表达较未转移的高。Kakisaka等[5]发现胰腺癌患者血浆中LRG-1浓度较正常人高,故推测LRG-1对胰腺癌的临床诊断有重大意义。Smith等[6]研究发现女性卵巢癌患者血清及肿瘤组织中LRG-1含量较正常女性高,故推

测卵巢癌细胞分泌LRG-1致使卵巢癌患者血清LRG-1浓度升高，进一步的研究将证明LRG-1可能作为诊断卵巢癌的一个生物标志。因此，我们可以得出：LRG-1可能在舌癌的发生过程中发挥重要作用，可作为诊断舌癌的一个辅助指标。本研究还发现，LRG-1能够促进血管内皮细胞的增殖和小管形成，因此可以初步推测LRG-1可能促进血管生成。

综上所述，LRG-1在舌癌组织中表达升高，推测其可作为诊断舌癌的一个辅助指标。LRG1能够促进血管内皮细胞的增殖和小管形成，推测其可能促进肿瘤血管的形成。血管生成在肿瘤的发生、发展及转移的过程中发挥着极为关键的作用，故推测LRG-1在肿瘤的发生、发展中意义重大，具体机制有待于进一步研究。研究舌癌中LRG-1的表达及其生物学作用，可为舌癌的生物治疗提供依据，并为其治疗提供新的靶点。

参考文献：

[1] Jung DW, Che ZM, Kim J, et al. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(2): 332-44.

[2] Seo BY, Lee CO, Kim JW. Changes in the management and survival rates of patients with oral cancer: a 30-year single-institution study [J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2016, 42(1): 31-7.

[3] Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review)[J]. Oncol Lett, 2014, 8(1): 7-11.

[4] He X, Wang Y, Zhang W, et al. Screening differential expression of serum proteins in AFP-negative HBV-related hepatocellular carcinoma using iTRAQ-MALDI-MS/MS[J]. Neoplasma, 2013, 61 (1): 17-26.

[5] Kakisaka T, Kondo T, Okano T, et al. Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 852(1/2): 257-67.

[6] Smith CR, Batruch I, Bauça JM, et al. Deciphering the peptidome of urine from ovarian cancer patients and healthy controls [J]. Clin Proteomics, 2014, 11(1): 23.

[7] Guergova-Kuras M, Kurucz I, Hempel W, et al. Discovery of lung cancer biomarkers by profiling the plasma proteome with monoclonal antibody libraries [J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10 (12): M111.010298.

[8] Ladd JJ, Busald T, Johnson MM, et al. Increased plasma levels of the APC-interacting protein MAPRE1, LRG1, and IGFBP2 preceding a diagnosis of colorectal cancer in women [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(4): 655-64.

[9] Wang X, Abraham S, Mckenzie JA, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-β signalling [J]. Nature, 2013, 499(7458): 306-11.

[10] Ucuzian AA, Greisler HP. *In vitro* models of angiogenesis[J]. World J Surg, 2007, 31(4): 654-63.

[11] Ng AC, Eisenberg JM, Heath RJ, et al. Human leucine-rich repeat proteins: a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(Suppl 1): 4631-8.

[12] Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats[J]. Curr Opin Struct Biol, 1995, 5(3): 409-16.

[13] O'donnell LC, Druhan LJ, Avalos BR. Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation [J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(3): 478-85.

[14] Haupt H, Baudner S. Isolation and characterization of an unknown, leucine-rich 3.1-S-alpha2-glycoprotein from human serum (author's transl) [J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1977, 358(6): 639-46.

[15] Weivoda S, Andersen JD, Skogen A, et al. ELISA for human serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 employing cytochrome c as the capturing ligand[J]. J Immunol Methods, 2008, 336(1): 22-9.

[16] 刁臻畅, 张坚松. LRG1基因在肝细胞癌中的表达情况研究[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2015, 12(2): 24-7.

[17] 刘兆国, 范方田, 赵林钢, 等. 肿瘤血管生成新靶点LRG1研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 6-9.

[18] Treps L, Gavard J. Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad[J]. Med Sci (Paris), 2015, 31(11): 989-95.

[19] Sun GW, Tang EY, Yang XD, et al. Salvage treatment for recurrent oral squamous cell carcinoma [J]. J Craniofac Surg, 2009, 20(4): 1093-6.

（编辑：孙昌朋）